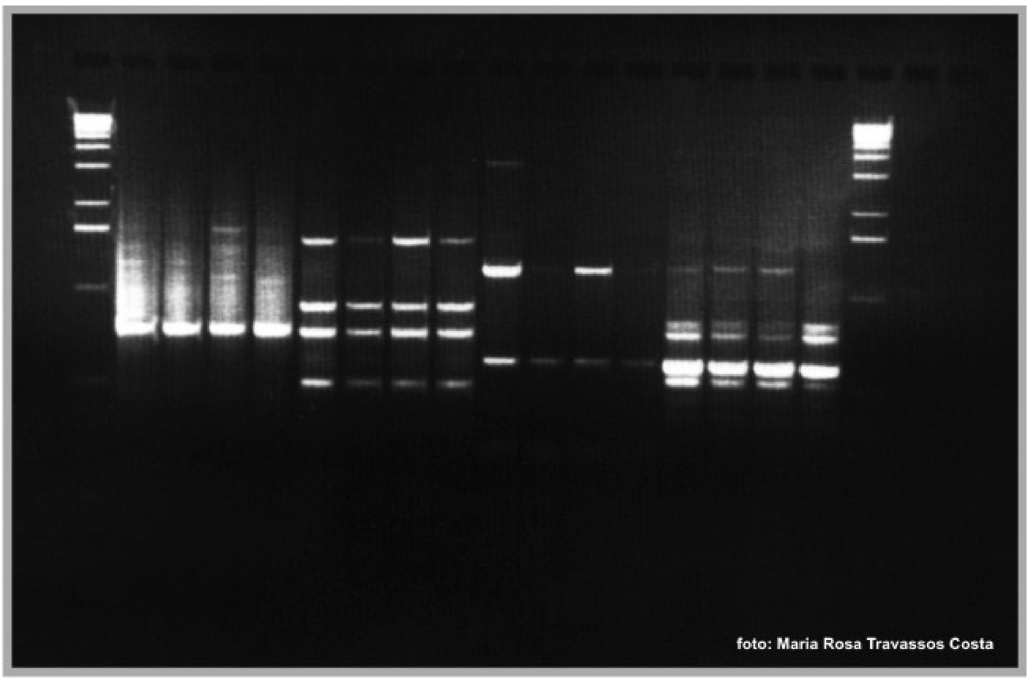
IV Encontro Amazônico de Agrárias

26 a 31 de março de 2012

Agricultura Familiar: mecanismos de desenvolvimento no cenário amazônico

BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AOS RECURSOS GENÉTICOS

[1]D.Sc. Maria Rosa Travassos da R. Costa
[2]D.Sc. Kenny Bonfim
[3]Sidney V. do Nascimento



Belém
2012

LISTA DE ABREVIATURAS:

PCR = Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RAPD= Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

DNA = ácido desoxirribonucléico

RNAse = ribonuclease

ng = nanograma

μg=micrograma

μl = microlitro

1-INTRODUÇÃO

As técnicas de Biologia Avançada têm gerado interesse em diversas áreas devido ao seu potencial de uso. Entretanto, para conseguir apreciar o potencial de utilização destas técnicas no dia-a-dia é necessário que se conheça as vantagens, limitações e aplicações. Neste sentido, o minicurso de extração, quantificação de DNA, marcadores moleculares e clonagem, tem como objetivo principal atingir estudantes que estejam engajados ou planejem participar ativamente em programas de caracterização, conservação e melhoramento visando o uso mais direcionado e apropriado dos recursos genéticos.

A extração de DNA é o primeiro passo para a utilização do mesmo em técnicas moleculares. Neste aspecto, a qualidade e integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA, que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado. A maneira de coletar e acondicionar o tecido, assim como o estado do mesmo, é fundamental para o sucesso da extração. Um dos aspectos importantes para o desenvolvimento das técnicas moleculares é a quantidade de DNA necessária nas reações, que varia em função da técnica molecular a ser utilizada. No caso de uma reação de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), por exemplo, são necessários somente alguns nanogramas de DNA, enquanto para análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) são necessárias quantidades de DNA na ordem de microgramas.

Normalmente os componentes da solução de extração variam de acordo com o protocolo utilizado, sendo que cada solução deve conter um tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses cuja função é proteger o DNA genômico.

Após a extração, torna-se necessário quantificar o DNA para verificar a quantidade e a ocorrência de degradação no mesmo. Entre as técnicas disponíveis para estimar a concentração de DNA as mais utilizadas são a leitura em espectrofotômetro e a análise comparativa em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Este trabalho tem como objetivo descrever algumas das metodologias de biologia molecular utilizadas no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental (LABGEN) e Laboratório de Fitopatologia, visando à identificação, classificação e conservação de recursos genéticos, levando-se em consideração as peculiaridades observadas. É uma abordagem prática, sendo que os protocolos apresentados são passíveis de alteração pelo usuário, conforme as particularidades do seu trabalho e necessitam do máximo de critério para a execução.

---

[1] Pesquisadora Dra. Genética e Biologia Molecular. Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal, 48 – Belém, PA; mrco@cpatu.embrapa.br

[2] Analista Dra. Genética e Biologia Molecular. Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal, 48, Belém,PA; kenny@cpatu.embrapa.br

[3] Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pará, Bolsista Laboratório de Genética. Embrapa Amazônia Oriental, svn_live@hotmail.com.

2-EXTRAÇÃO DE DNA

No processo de caracterização genética das espécies, utilizando-se técnicas moleculares, uma das etapas principais é a extração de DNA, já que qualquer problema na mesma compromete os passos subseqüentes. Por outro lado, o êxito nesta etapa depende de vários fatores, como: a adequação do protocolo, a qualidade do material usado no processo de

extração e, sobretudo o manuseio de utensílios de maneira adequada para evitar contaminação. A seguir serão descritas as etapas utilizadas no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental para a otimização do protocolo de extração de DNA a partir de sangue total e tecido vegetal.

2.1- Extração de DNA a partir de sangue total

Protocolo 1:

-Coletar amostras de sangue com EDTA para evitar coagulação;
-Conservar o material resfriado até à extração;
-Transferir 150 µl de cada amostra para tubos de 15 ml identificados;
-Adicionar 5 ml de tampão STE pré-aquecido, 250 µl de SDS 10% pH 7,2 e 100 µl de ribonuclease (10 mg/ml);
-Incubar as amostras a 37 ^{0}C em contínua agitação por uma hora (agitar de 10em 10 minutos).
-Adicionar 100 µl de proteinase K e deixar “overnigth” a 55 ^{0}C em banho maria;
-Misturar levemente em vórtex;
-Levar os tubos à temperatura ambiente e adicionar 2 ml de NaCl 5 M. Agitar gentilmente por 15segundos. Adicionar 5 ml de clorofórmio e agitar por 30 minutos até a homogeneização;
-Centrifugar a3000 rpm por 15 min;
-Transferir o sobrenadante e adicionar volume igual de álcool 95% gelado;
-Inverter os tubos gentilmente para precipitar o DNA;
-Transferir a nuvem de DNA para tubos de 1,5 ml;
-Centrifugar durante 10 minutos (4^0 C e 4.000 rpm);
-Acrescentar 1000µl de etanol 70 % para remover sais;
- Centrifugar durante 10 minutos (4^0 C e 4.000 rpm);
-Verificar se há ocorrência de impurezas. Se houver, repetir a lavagem com etanol 70 %;
-Retirar o líquido e deixar secando à temperatura ambiente, por um período aproximado de doze horas ou em estufa à 37 ^{0}C por 20 minutos ;
-Ressuspender o DNA com 200 a 400 µl de tampão TE sendo o volume de acordo com a medusa observada (pellet);
-Guardar em geladeira a 4 ^{0}C até a quantificação;
-Estocar em freezer.

2.2- Extração de DNA vegetal

Protocolo 1:

- Coletar amostras de tecido fresco, colocando-as em sacos plásticos identificados.
- Colocar os sacos em isopor com gelo;
- Congelar previamente cadinhos e pistilos de porcelana (-20 ^{0}C);
- Lavar as amostras (folhas) em água corrente, com hipoclorito 10% e, em seguida, com água destilada, enxugar.
- Colocar nitrogênio líquido e PVP (Polivinilpirrolidone) nas folhas, já cortadas, presentes no cadinho e quebrar o tecido com o pistilo. O tecido não deve descongelar;
- Colocar o material macerado em tubo falcon até a marca de 3ml, previamente identificados;
- Adicionar 100 µl de beta-mercaptoetanol (se necessário, pois depende da espécie vegetal);
- Adicionar 3ml de solução extratora ao tubo e levar ao vortex;
- Colocar em banho-maria (65 ^{0}C) por ilhota, invertendo os tubos a cada 10 minutos;
- Deixar esfriar na capela;
- Adicionar 3ml da solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1);
- Agitar por inversão 120 vezes e centrifugar a 1000rpm/10min;

- Pipetar o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar ao sobrenadante etanol 95% gelado (o mesmo volume do sobrenadante) 3ml;
- Homogeneizar por inversão, aparecem as fitas de DNA;
- Centrifugar a 1000rpm/10min;
- Remover o álcool e adicionar ao pellet 3ml de etanol 95% gelado;
- Centrifugar a 1000rpm/10min;
- Remover o álcool e deixar secar na bancada de um dia para o outro (se houver necessidade, pode-se secar o pellt em estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas e ressuspender em seguida);
- No dia seguinte, ressuspender o DNA com TE contendo RNAse;
- Levar à estufa, a uma temperatura de 37°C, agitando de 10 em 10min;
- Guardar em geladeira a 4°C até a quantificação. Estocar em freezer.

Protocolo 2:
- Whash Buffer 1600µl;
- Betamercaptoetanol 1 gota;
- Macerar o material (folha, meristema...) até ficar líquido;
- Transferir o macerado para eppendorf de 2ml;
- Centrifugar a 13000rpm a 4°C por 10 min;
- Descartar sobrenadante;
- Adicionar 800µl de CTAB;
- Vortexar até desprender o material do fundo do eppendorf;
- Levar ao banho-maria por 30 min;
- Adicionar 800 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1);
- Vortexar para homogeneizar;
- Centrifugar a 13000rpm 4°C por 10 min;
- Retirar sobrenadante com micropipeta e transferir pra outro eppendorf já com 800 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico;
- Centrifugar a 1300rpm 4°C por 10 min;
- Transferir sobrenadante e acrescentar 70 µl de acetato de amônio e 700 µl de álcool isopropílico;
- Precipitação dos ácidos nucléicos (pode guardar em freezer);
- Centrifugar a 13000rpm 4°C por 10 min;
- Descartar álcool isopropílico (secar em papel);
- Acrescentar 1ml de álcool 70%;
- Centrifugar por 2 minutos a 13000rpm 4°C;
- Descartar álcool;
- Secar em papel;
- Ressuspender em água ultra pura (50 µl).

2.3- Preparo do Whash Buffer (200ml)
- 23,36g de NaCl
- 400 µl de EDTA 0,5M pH 8,0
- 2000 µl/2ml de Tris-HCl pH 8,0
- Após o preparo, autoclavar e ao esfriar adicionar 0,1g de BSA

2.4- Problemas comumente encontrados, possíveis causas e soluções durante a extração de DNA.

Etapa do Processo	Problema Encontrado	Possíveis Causas e Soluções
Coleta de amostras	Oxidação das amostras	- Selecione tecido tenro de plantas jovens e mantenha amostras de tecido em gelo até o início do processo de extração ou liofilização.
Maceração	Amostras de difícil maceração ou pulverização.	-Pulverização total é necessária. Utilize tecido tenro, faça uso de moedores elétricos ou agitadores de alta potência para facilitar o processo de maceração.
Tampão de Extração	Suspensão do tecido macerado em tampão de extração não ocorre por completo.	- Verifique se a proporção tampão de extração/tecido macerado é adequada. - Verifique se a temperatura do banho-maria está ajustada a 60°C. Agite tubos gentilmente para facilitar o contato do tampão com o tecido macerado.
Formação de fases	Após a adição de isopropanol:álcool isoamílico e centrifugação, não ocorre a formação de fases.	- Verifique se as concentrações de reagentes utilizadas foram adequadas (excesso de espuma indica que o álcool isoamílico não foi adicionado adequadamente); - Verifique se o tempo e condições de centrifugação foram adequados.
Precipitação do DNA/Rendimento	Quantidade de DNA precipitado é muito pequena, rendimento escasso.	- Verifique se o tecido amostra é preferencialmente oriundo de partes tenras de plantas jovens; - Verifique se a proporção inicial de tampão de extração e a amostra de tecido foi adequada; - Verifique se a maceração (pulverização) da amostra de tecido foi completa; - Novo ciclo de precipitação auxiliada por CTAB pode ser necessária; - Utilize condição de baixa temperatura na etapa de precipitação (álcool etílico gelado/ambiente de baixa temperatura); - Verifique se o tempo destinado à precipitação foi eficiente
	Pellet de DNA precipitado apresenta coloração escura	- DNA contaminado por compostos secundários (pigmentos) e/ou outras substâncias oxidadas. Repetir as etapas de lavagem do DNA com etanol. Não resolvido, resuspender e re-precipitar o DNA e prosseguir com lavagens repetidas

		com etanol.
	Pellet de DNA é muito grande, não dissolve em tampão TE ou TBE	- DNA complexado com outras substâncias (polissacarídeos). Deixar em temperatura ambiente de um dia para o outro, ou aquecer por 65°C por 30 minutos. Após este período quantificar o DNA dissolvido e verificar se a concentração estimada é suficiente para os experimentos a serem desenvolvidos. Caso seja, transferir o sobrenadante para outro tubo e descartar o pellet não-dissolvido. Caso não seja, ressuspender pellet, fazer lavagens com NaCl 1 a 5 lavagens repetidas com etanol.
Eletroforese	Poço do gel não comporta todo o volume da reação.	- Verifique dimensões do dente do pente utilizado e o volume esperado; - Verifique o volume e conseqüente espessura do gel; - Verifique se a superfície onde o gel foi preparado está nivelada; - Funda novamente a agarose e prepare novo gel adicionando o volume de agarose necessário ou nivelando a superfície.
Visualização do gel na luz U.V. após a eletroforese	Nada aparece no gel, nem mesmo padrão de fragmentos de tamanho conhecido.	- Verifique se o brometo de etídio foi adicionado ao gel e no tampão de carregamento. Caso negativo, core o gel por algumas horas em uma solução diluída de brometo de etídio (0,5 μg/ml) com agitação branda; - Verificar a concentração de brometo de etídio utilizada (deve ser de 20 μg/ml); - Verifique se o padrão de fragmentos de tamanho conhecido foi adicionado; - Verifique se a eletroforese não procedeu por muito tempo, com conseqüente eliminação do DNA do gel; - Verifique se o DNA não se encontra retido nos poços de carregamento; - Concentração de DNA adicionada ao gel pode ter sido muito baixa. Verifique se não foi adicionado um excesso de TE ou TBE ao pellet de DNA, diluindo a solução excessivamente.
	Amostra de DNA não sai do poço de carregamento do gel	- DNA anda contaminado (polissacarídeos).
	Aparece arraste vertical ao invés de banda	- Isto ocorre quando se usa água no lugar de tampão TBE ou comete-se erros na diluição

	característica de DNA intacto.	do tampão TBE durante o preparo do gel de eletroforese.
	Banda única de DNA intacto presente, mas ocorre arraste vertical em direção ao pólo positivo.	- DNA de baixa qualidade: desnaturado. Obter amostra de boa qualidade.
	Banda única de DNA intacto presente, mas ocorre arraste vertical com banda de intensa coloração na parte inferior (menor comprimento).	- DNA não foi tratado com RNAse ou RNAse inativa. Tratar com nova RNAse e correr outro gel antes de iniciar experimentos de análise de DNA.
Visualização do gel na luz U.V. após a eletroforose	Arraste intenso na parte central da banda única de DNA intacto e fraco nas laterais.	- Eletroforose submarina foi conduzida com imersão insuficiente do gel, i.e. pouco volume de tampão recobrindo gel o que criou um gradiente de temperatura; corra novamente certificando-se de que se tenha pelo menos 1,5 cm de tampão recobrindo o gel para cobrir o gel que trabalham com corrente elevada por muito tempo e portanto mais sujeitas a aquecimento excessivo
Após a fotografia do gel de eletroforese	Fotografia polaroid excessivamente clara ou escura	- Repita a fotografia alterando o tempo de exposição e/ou a abertura utilizada
	Gel aparece fora de foco	- Repita a fotografia focalizando cuidadosamente a superfície superior do gel sob luz branca com algo escrito; - Verifique o estado e limpeza das lentes da câmera fotográfica utilizada; - Verifique se o gel não se movimentou durante a fotografia em função da película de líquido entre o gel e o trasiluminador.

2.5-Componentes básicos do tampão

Tris Hcl- estabiliza o pH por volta de 8,0;
NaCl- auxilia na dissociação de proteínas;
SDS- atua como detergente para solulibilizar as membranas;
EDTA- atua como agente inativante de DNAses.

3-QUANTIFICAÇÃO VISUAL DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Após o processo de extração, torna-se necessário proceder à quantificação, para verificar a quantidade de DNA obtida que é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de PCR (reação de polimerase em cadeia) e seus variantes. Este procedimento é necessário porque a concentração de DNA inadequada implicará em falhas nas etapas subseqüentes. O DNA em excesso na reação RAPD pode resultar na falha completa da reação, devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Por outro lado, a baixa concentração de DNA resultará em amplificação errada ou não amplificação de certos segmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira & Grattapaglia,1995). Vale ressaltar que a quantidade de DNA obtida varia em função do genoma e da eficiência do protocolo de extração utilizado. Após a quantificação e qualificação do DNA, devem ser feitas soluções de trabalho adequadas à concentração exigida no protocolo que será utilizado.

3.1-Diluição do DNA lambda

Geralmente, utiliza-se como padrão o DNA lambda intacto fazendo a diluição para uma concentração de trabalho. É importante que se aplique no gel quantidades crescentes de DNA padrão, que cubram o intervalo de concentração no qual espera-se que as amostras se enquadrem.

Exemplo de diluição do DNA lambda sem corte:

Concentração estoque do DNA lambda 458µg/ml (verificar a concentração na embalagem)

Então se dilui pela fórmula:

$\mathbf{C_1.V_1 = C_2V_2}$

Onde: C_1= concentração estoque;
V_1= volume de DNA estoque a ser pipetado;
C_2= concentração de trabalho e;
V_2=volume final de solução.

C_1= 458 µg/ml = 458 ng/µl

Exemplo para C_2= 50 ng/µl e V_2= 100 µl

458. V_1= 50. 100
V_1= 10,92 µl de lambda
V_{TE} = 89,08 de TE

Pode-se diluir para diversas concentrações como 100 ng/µl e 200 ng/µl. Utiliza-se normalmente três concentrações no início do gel para comparação.

3.2-Quantificação

O volume da solução de DNA a ser quantificado é aplicado no gel. Geralmente, utiliza-se de 2 a 5 µl da solução estoque, dependendo da quantidade total de DNA obtida na extração. Esta pode ser empiricamente julgada pela quantidade de precipitado obtido e pela viscosidade da solução onde o DNA está ressuspenso.
Prepara-se o DNA na seguinte concentração;

Amostras	**DNA (µl)**	**Tampão de carregamento (µl)**	**Água estéril (µl)**
Genótipo 1	3	3	4
Genótipo 2	3	3	4
Genótipo 3	3	3	4
Genótipo 4	3	3	4

3.3-Eletroforese

É a migração de moléculas carregadas em um campo elétrico, que é determinada pelo tamanho da molécula e sua carga. A movimentação é através de um gel que funciona como um filtro separando as moléculas. A separação dos fragmentos depende da concentração da agarose, do tamanho do fragmento e da voltagem aplicada durante a eletroforese. Vale lembrar que esses fatores são interligados, ou seja, uma concentração inadequada de agarose afetará a mobilização das moléculas e assim por diante.

3.4-Interpretação do gel

Observe a intensidade das bandas dos genótipos em relação à intensidade das concentrações padrão de DNA lambda.

Quando não se utiliza RNase, observa-se uma linha de RNA na parte inferior do gel (Figura 1).

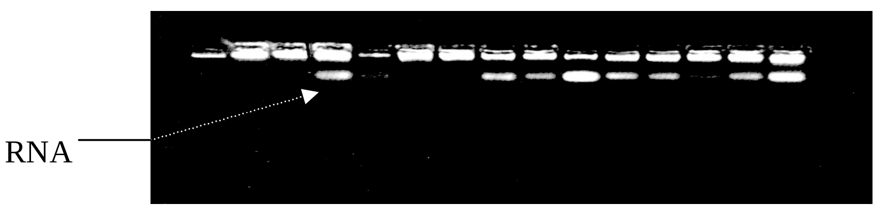


Figura1 – DNA genômico com presença de RNA.

É importante avaliar a qualidade do DNA, o mesmo não deve migrar no gel. Se os fragmentos de DNA ocorrerem ao longo da linha da canaleta, o DNA está degradado. Normalmente a degradação ocorre pelo manuseio e armazenamento inadequado, período de armazenamento muito longo, dentre outros fatores. Quanto mais DNA ocorrer ao longo da linha, maior é a degradação. Amostras de DNA com razoável degradação devem ser descartadas (figura 2).

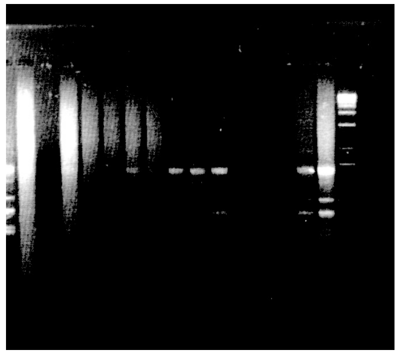


Figura 2 – PCR com DNA genômico degradado.

4-DILUIÇÃO DO DNA GENÔMICO QUANTIFICADO.

Após a quantificação, o DNA é diluído pela fórmula $C_1.V_1 = C_2.V_2$, onde:
C_1 = é a concentração lida de DNA;
V_1 = é o volume a ser pipetado do DNA concentrado;
C_2 = é a concentração de trabalho;
V_2 = é o volume final correspondente entre 500 µl a 1000 µl.

Exemplo da diluição do DNA genômico de cavalo para a concentração de 5 ng/µl:

$C_1.V_1 = C_2 .V_2$

313 ng/µl. V = 5 ng/µl.500 µl

$V = \frac{5 . 500}{313}$

V = 8 µl de DNA

492 µl de água estéril

Exemplo da diluição do DNA genômico de cavalo para a concentração de 2,5 ng /µl:

$C_1.V_1 = C_2V_2$

313 ng/µl.V = 2,5 ng/µl.500 µl

$V= \frac{2.5. 500}{313}$

V= 4 µl de DNA

496 µl de água estéril

5-QUANTIFICAÇÃO DE DNA EM FLUORÍMETRO

O equipamento que usaremos será o Hoefer DyNA Quant 200, que é um fotômetro com o filtro de fluorescência, com uma fonte fixa de passagem de excitação a 365 nm e um filtro de passagem de emissão a 460 nm. Ele foi desenhado para a quantificação de baixas concentrações de DNA usando o corante chamado de Hoechst 33258, também chamado de

bisbenzimida. O corante Hoechst 33258 apresenta alterações nas características de fluorescência na presença de DNA, que permite a estimativa da concentração na solução. Na ausência de DNA, o espectro de excitação do corante Hoechst 33258 possui um pico a 356 nm e o espectro de emissão possui um pico fraco a 492 nm. Quando Hoechst 33258 liga-se ao DNA, esses picos movem-se para 365 nm de excitação e 458 nm de emissão. No poço da cubeta, a amostra é exposta a luz filtrada (365 nm ± 7 nm) de uma lâmpada de mercúrio. Essa luz excita o complexo corante-DNA, causando a luz a emitir um pico a 458 nm. O filtro de emissão colocado em frente ao fotodetector permite apenas fluorescência de 460 ± 15 nm a ser detectada. Portanto, a fluorescência medida é um indicador direto de concentração de DNA. A medida de fluorescência não é uma unidade absoluta e sim relativa a um branco e a um padrão com concentração conhecida.

1- Preparar as soluções necessárias para o ensaio e a solução DNA padrão ("calf thymus" DNA)

<u>SOLUÇÕES ESTOQUES</u>

Tampão 10 X TNE Solução Estoque

- (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2 M NaCl, 100 ml)
- 1,211 g de Tris base (PM = 121,14)
- 0,372 g de EDTA, sal dissódico, dihidratado (PM = 372,20)
- 11,689 g de NaCl
- Completar volume até 80ml com água mQ
- HCl concentrado até pH 7,4 com HCl concentrado.
- Completar volume até 100 ml
- Filtrar antes do uso (0,45 µm).
- Armazenar a 4°C por até 3 meses.

Solução de Corante Hoescht 33258 (1 mg/ml)

USE MÁSCARA E LUVAS

Hoescht 33258	10 mg
Água mQ	10 ml

Não filtrar. Armazenar a 4°C por até 6 meses protegendo da luz.

Padrão de DNA "calf thymus" (100 µg/ml)

Solução estoque 1ng/µl de padrão	100 µl
10 x TNE	100 µl
Água mQ	800 µl

Solução de Trabalho 1 X TNE Baixa concentração (A)
(Concentração final do DNA a medir entre 10 a 500 ng/ml)

0,1 µg/ml de H 33258 em 1 X TNE (0,2 M NaCl, 10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 7,4)

Solução estoque de H 33258 10 µl

10 X TNE	10 ml
Água mQ destilada	90 ml

2 – Zerar o instrumento. Prepare um branco usando 2 ml da solução de trabalho A (baixa concentração). Seque o lado da cubeta com lenço de papel. Insira a cubeta no poço, feche a tampa, e aperte o botão **<ZERO>**. Depois que aparecer 0 (zero) no display, remova a cubeta.
3 – Calibrar Instrumento. Aplique 2 µl da solução de DNA padrão nos 2 ml de Solução de Trabalho A. Misture com pipetagem várias vezes. Coloque a cubeta no poço, feche a tampa e aperte o botão **<CALIB>**. Digite 100 e aperte **<ENTER>**. Depois que o valor aparecer no display, remova a cubeta.
4 – Zerar o instrumento. Retire a cubeta, esvazie e limpe. Seque a cubeta sobre lenço de papel. Adicione 2 ml da Solução de Trabalho A (baixa concentração). Insira a cubeta no poço e feche a tampa, e aperte o botão **<ZERO>**. Depois que aparecer 0 (zero) no display, remova a cubeta.
5- Ler amostra. Adicionar 2 µl da amostra e misture bem. Coloque a cubeta no poço, e feche a tampa e registre a leitura.
6- Ler as amostras subseqüentes. Repetir os passos 4 e 5 para cada amostra.

Importante:
- Ligue o instrumento 15 minutos para estabilizar a lâmpada antes de medir.
- Use luvas, pois, o corante pode ser mutagênico.
- Todas as soluções devem estar à temperatura ambiente antes de medir a fluorescência.
- Preparar a solução de trabalho fresca para uso do dia.
- Filtrar o tampão TNE antes de acrescentar o corante.

6-MICROSSATÉLITES

6.1-Componentes da reação

DNA molde- é a amostra de DNA dos indivíduos a serem analisados.

Enzima Taq DNA polimerase- é a enzima que catalisa a reação de amplificação do DNA molde.

Tampão- propicia o pH ideal para o funcionamento da enzima.

$MgCl_2$- atua como co-fator da enzima e sua concentração influencia a reproducibilidade da técnica, pois afeta a eficiência de amplificação da enzima.

Primer- é uma seqüência de nucleotídeos e que ao se anelar por complementariedade de bases serve como iniciador da reação de amplificação. Usa-se um par de *primers*, um para a sequência *forward* e outra para a sequência *reverse*, que podem estar separados ou usados em conjunto.

Oligonucleotídeos (dNTPs)- são os nucleotídeos constituintes do DNA: Adenina, Guanina, Citosina e Timina que são incorporados à seqüência do primer durante a reação de amplificação.

Água- é usada para completar o volume da reação.

BSA: Ou albumina bovina sérica, funciona como estabilizador da reação. Usa-se de 10 a 100µg/ml.

6.2-Protocolo

Água- 6,4 µl
Tampão - 2 µl
$MgCl_2$ – 0,4 µl
DNTP-3 µl
DNA- 3 µl
BSA – 3 µl
Primer forward + Primer reverse - 2 µl
Taq- 0,2 µl

Total = 17 µl de mix e 03 µl de DNA

7-PREPARO DO GEL

Para a eletroforese dos produtos gerados por microssatélites, será utilizado gel de agarose em concentração de 3%. A concentração maior é utilizada para permitir que haja separação de produtos com menor diferença de tamanho, já que alelos de locos de microssatélite podem variar em apenas um par de nucleotídeos. Entretanto, mesmo a uma alta concentração de agarose, não é possível obter esse nível de discriminação, e por isso a maioria das análises de marcadores microssatélites é feita em gel vertical de poliacrilamida. A corrida em gel de agarose pode ser usada na fase de seleção de *primers*, pois assim é possível baratear uma fase da análise de microssatélites.

A interpretação dos géis é feita da seguinte forma: alelos com o mesmo padrão de migração são considerados iguais e cada alelo recebe um código. O número máximo de alelos a ser observado por individuo depende da ploidia da espécie e do nível de endogamia dos materiais.

No gel da Figura 3, pode-se considerar que há diferentes alelos pelo seu diferente padrão de corrida e que apenas os indivíduos 2 e 5 são heterozigotos.

A quantidade de locos ou *primers* microssatélites a serem analisados depende da característica da espécie e principalmente do nível de variabilidade dos genótipos; espécies com base genética mais estrita precisam ser analisadas com mais *primers*. De posse da base de dados obtida da interpretação dos géis, são realizadas as análises de acordo com os objetivos da pesquisa.

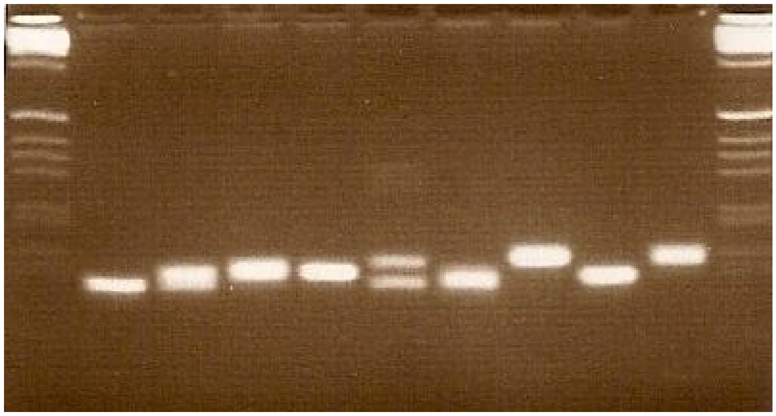


Figura 3 – Exemplo de corrida de marcadores microssatélites em gel de agarose a 3%, onde foi usado um *primer* para nove genótipos.

Recursos necessários:

Neste item estão descritos os recursos mínimos necessários para se desenvolver a extração de DNA:

Água estéril para o preparo das soluções;
Agitador magnético com aquecimento;
Autoclave;
Banho-maria;
Balança eletrônica;
Centrífuga refrigerada;
Estufa com temperatura regulável;
Freezer (- 20^0 C);
Forno de microondas;
Máquina de fazer gelo em escama;
Mini cubas para quantificação de DNA;
Pipetas automáticas (20 µl , 50 µl , 200 µl e 1000 µl);
Potenciômetro;
Refrigerador duplex;
Vórtex;
Utensílios de laboratório (vidrarias, bandejas, eppendorfs, ponteiras, luvas, espátulas, tesouras, máscaras, suporte para eppendorfs...).

8- ELUIÇÃO OU PURIFICAÇÃO DE DNA DE GEL DE AGAROSE

Este protocolo é designado para extrair e purificar DNA de 70pb até 10kb de gel de agarose, para posteriormente serem clonados e sequenciados.

OBS: Nesse tipo de procedimento normalmente são utilizados Kits de extração e o recomendado é que se siga o protocolo de cada fabricante.

Protocolo do fabricante PROMEGA - "Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System"

1- Cortar a banda de DNA do gel de agarose;

2- Pesar e adicionar 10 µL da solução "Membrane Binding Solution" para cada 10 mg de gel;

3- Incubar a 65°C até dissolver completamente o gel;

4- Inserir a minicoluna no tubo coletor e transferir o dissolvido para a minicoluna;

5- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente;

6- Centrifugar por 1 minuto a 13500 rpm (neste passo, o DNA ficará preso na pequena membrana situada no fundo da minicoluna e o restante passará para o tubo coletor)

7- Descartar o que ficou no tubo coletor;

8- Adicionar 700 µL da solução "Membrane Wash Solution (ethanol added) para lavar;

9- Centrifugar por 1 minuto a 13500 rpm;

10- Descartar o que passou para o tubo coletor;

11- Adicionar 500 µL da solução "Membrane Wash Solution (ethanol added) para lavar;

12- Centrifugar por 5 minuto a 13500 rpm;

13- Descartar o que passou para o tubo coletor;

14- Centrifugar por 1 minuto a 13500 rpm, para retirar o resíduo de etanol;

15- Transferir a minicoluna para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL;

16- Adicionar 50 µL de água ultra-pura;

17- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;

18- Centrifugar por 1 minuto a 13500 rpm;

19- Descartar a minicoluna e estocar o DNA à -20°C

20- Quantificar 1 µL em gel de agarose.

9- SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM

Técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies, assim como para uma melhor classificação das novas espécies que poderão ser utilizadas em projetos de análise da biodiversidade. Além disso, a utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento de genes conservados, para a identificação dos recursos genéticos pode possibilitar ainda desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia, genética de populações, entre outros.

O sequenciamento de DNA é um processo que determina a ordem dos nucleotídeos em uma amostra. Existem vários métodos disponíveis, e cada um apresenta vantagens e desvantagens. Esta técnica foi descrita primeiramente por Sanger *et al*. em 1977 e é considerado um dos feitos científicos mais importantes da ciência. O DNA está presente em todos os seres vivos, sejam eles animais, vegetais ou microrganismos. O gene é a unidade fundamental de informação nos seres vivos, um segmento de DNA capaz de codificar a informação necessária para a síntese de um produto biologicamente ativo. O DNA é responsável pela hereditariedade e a variabilidade necessária para o processo evolutivo.

Para o sequenciamento de qualquer fragmento de DNA pelas técnicas tradicionais, este precisa ser primeiramente inserido (ou clonado) em um vetor de clonagem. Os vetores de clonagem mais simples e os mais utilizados na clonagem de genes, são os baseados em pequenos plasmídeos bacterianos. Há um grande número de vetores diferentes disponíveis assim como cepas de *Escherichia. coli*, que podem ser obtidas em fornecedores comerciáveis. Os vetores funcionam como um veículo que transporta o gene para o interior da célula

hospedeira (célula competente), que é normalmente uma bactéria, embora outras células vivas possam ser utilizadas. O vetor de clonagem possui elementos que permitem sua autorreplicação bem como alguns genes marcadores (resistência a antibióticos) que servem para seleção das bactérias que receberam o vetor. Dentro da célula hospedeira o vetor multiplica-se, produzindo várias cópias idênticas de si próprio e do fragmento de DNA (inserto) ligado a ele. Após várias divisões celulares cada célula contém uma ou mais cópias da molécula de DNA recombinante. Este DNA é isolado e está pronto para ser sequenciado (Souza & Brusamarello).

10- REAÇÃO DE LIGAÇÃO VETOR/INSERTO

O protocolo mais tradicional para clonagem molecular consiste em ligar os dois fragmentos de DNA utilizando a enzima T4 DNA Ligase que catalisa ligações fosfodiéster, ou seja, catalisa a ligação covalente entre dois fragmentos de DNA. Os vetores de clonagem ou plasmídeos são moléculas de DNA circular extra cromossomais que servem como veículo que transporta o gene de estudo para o interior de uma célula hospedeira, geralmente uma bactéria, carregando consigo informações genéticas. Estes DNAs são muito utilizados em biologia molecular, pois são pequenos e de fácil manipulação.

Antes da clonagem, em paralelo, deve-se preparar os insertos (o que se deseja clonar: DNA genômico, cDNA, um gene específico, etc) e o vetor que pode ser de diferentes tipos.

Importante: A quantidade de vetor e inserto irá depender de quantificação prévia, estes deverão ser adicionados a reação de ligação na proporção de quatro moléculas de inserto para cada uma molécula de vetor. O tamanho dos mesmos também influenciará na reação de ligação. Desta forma deve-se atentar para as recomendações de cada fabricante.

10.1-Componentes da reação

Vetor- Plasmídeo que irá receber o inserto.
Inserto- é o fragmento de DNA eluído do gel após o procedimento da reação de PCR.
Enzima T4 DNA Ligase- é a enzima que catalisa a reação de ligação do inserto com o vetor.
Tampão- propicia o pH ideal para o funcionamento da enzima.

Vetor	X µL
Inserto	X µL
Tampão 10X	1,0 µL
T4 DNA Ligase	0,5 µL
H_2O	X µL
Volume final =	10µL

10- CÉLULAS COMPETENTES DE *Escherichia coli* PARA CHOQUE TÉRMICO (protocolo "Manual de Transformação Genética de Plantas").

A competência natural das bactérias para receber o DNA do meio circundante é um fenômeno raro (verificando-se apenas em determinadas espécies e em condições fisiológicas específicas). Assim, é necessário desenvolver essa capacidade, ou seja, é necessário tornar as células competentes para viabilizar a introdução do DNA recombinado (rDNA) no hospedeiro selecionado. Ao processo de entrada de DNA livre (isto é, DNA em solução, fora do invólucro celular) na célula dá-se o nome de transformação. Dentro da célula hospedeira o vetor

multiplica-se, produzindo numerosas cópias idênticas não só de si próprio, mas também do gene que transporta. Quando a célula hospedeira se divide, a sua descendência recebe cópias das moléculas de DNA plasmidial, continuando depois a replicação dos vetores. Após um grande número de divisões celulares, é produzido uma colônia ou clone, de células hospedeiras idênticas. Cada célula no clone contém uma ou mais cópias da molécula de DNA recombinante. O gene transportado pela molécula recombinante é agora conhecido como sendo clonado.

Protocolo:

Importante: Todo o procedimento deve ser feito em fluxo laminar.

1- Com o auxílio de uma alça de platina, estriar de uma suspensão bacteriana ,crescida por 16 horas, em uma placa de petri contendo meio LB.

2- Incubar durante 16 horas, a 37°C;

3- Transferir uma colônia isolada para tubo contendo meio LB líquido; agitar suavemente para dispersar a colônia no meio.

4- Incubar durante 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm;

5- Transferir 1mL da suspensão bacteriana para 50mL de meio LB.

6- Incubar a 37°C sob agitação de 250 rpm por 2 a 2,5 horas. Após esse período, determinar absorbância a 600nm da suspensão bacteriana em um espectrofotômetro. O número de células não deve ultrapassar 10^8 células/mL, ou seja, A_{600} entre 0,3 e 0,4;

Importante: Os 50 mL de meio LB líquido devem estar em um frasco de 200mL e pré aquecido a 37°C. Nas etapas seguintes as células devem permanecer no gelo e as centrifugações devem ser feitas a 4°C.

7- Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. descartar o sobrenadante e inverter o tubo ,em um papel de filtro previamente esterilizado, durante 20 segundos, para eliminar traços de meio;

8- Ressuspender cuidadosamente as células em 15 mL da solução de $CaCl_2$ 0,1M gelado para cada 50mL de suspensão;

9- Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C;

10- Ressuspender cuidadosamente as células em 1 mL da solução de $CaCl_2$ 0,1M + glicerol 10% gelado;

11- Distribuir, em tubos tipo eppendorf, em alíquotas de 50 μL, transferir imediatamente os tubos para nitrogênio líquido e manter a -70°C, até que as células sejam usadas.

11- TRANSFORMAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* POR CHOQUE TÉRMICO

É o processo em que serão introduzidas moléculas de DNA em uma célula hospedeira (célula competente). Na transformação com cloreto de cálcio, ou choque térmico como é mais conhecida, as bactérias e o vector, contendo o inserto, são misturados com uma solução de cloreto de cálcio e sofrem um choque térmico. Os íons de cálcio têm a função de neutralizar as cargas negativas do DNA e da membrana bacteriana, facilitando a passagem do vetor pela membrana no momento do choque térmico (que, portanto, tem a mesma função do choque elétrico).

Protocolo:

1- Adicionar 2 µL da reação de ligação em 50 µL de célula competente. Misturar gentilmente;

2- Incubar no gelo por 20 minutos;

3- Transferir para banho-maria à 42°C por 45 a 50 segundos;

4- Retornar para o gelo imediatamente e incubar por 2 minutos;

5- Adicionar 950 µL de meio LB líquido;

6- Incubar por 1 a 1:30 horas a 37°C a 150 rpm;

7- Centrifugar por 30 segundos para baixar as células (esse processo maximiza a eficiência de obtenção de células transformadas com o DNA de interesse);

8- Retirar com a pipeta 900 µL do sobrenadante;

9- Ressuspender o restante delicadamente e plaquear em placa de petri contendo LB sólido com ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0,1 mM e X-gal 40µg/mL;

10- Incubar a 37°C por 16 horas.

9- Considerações finais

Este trabalho é uma abordagem prática no qual é apresentada uma descrição condensada dos protocolos de biologia molecular que foram otimizados nos Laboratórios de Genética e Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Devido às particularidades do material e as condições intrínsecas de cada laboratório, as propostas são passíveis de alteração ou substituição pelos usuários.

10- Literatura Consultada

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

COSTA, M. R., Jose Luis Vega-Pla, PEDRO PABLO, MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO, COSTA,M.R, JUAN VICENTE DELGADO BERMEJO Variabilidad genética de caballos brasileños. REVISTA DE SANIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS DE ESPAÑA. , v.61, p.221 - 222, 2005.

COSTA,M.R, MARQUES, J. R. F., Jose Luis Vega-Pla, JUAN VICENTE DELGADO BERMEJO, MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO, PEDRO PABLO VARIABILIDADE GENÉTICA DE EQUINOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento (Online). , v.35, p.48 - 51, 2005.

ALBUQUERQUE, M. S. M., EGITO, A. A., MARQUES, J. R. F., ANA CIAMP, MARIANTE, A. S., **COSTA,M.R**, CASTRO, PAIVA, CONTEL, SILVA VARIABILIDADE GENÉTICA EM BÚFALOS DETERMINADA POR MARCADORES RAPD. Pesquisa Agropecuária Brasileira. , v.41, p.623 - 628, 2005.

COSTA,M.R. Caracterização genética de eqüídeos da raça marajoara por microssatélites. Tese de doutorado. Universidade Federal do Pará. 2007.93p.

DOYLE & DOYLE, 1987; modificado por Patrocínio, E., 2007**. Protocolo para Extração de DNA em Tecido Vegetal.**

FERREIRA, M.E.;GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP e análise genética.** Brasília, EMBRAPA-CENARGEN,1995.pp.220.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982**.**

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences 74:5463-5467, 1977

SOUZA,A.L.F & BRUSAMARELLO, L.C.C. **Sequenciamento de DNA: decifrando o manual de instruções dos seres vivos.** Genética na Escola, v.1, p. 45-52, 2009.

Anexos

Soluções Básicas para Biologia Molecular

Neste item estão descritas algumas soluções de uso corrente na Biologia Molecular. Vale ressaltar os cuidados necessários durante o preparo de soluções:
-Ter sempre soluções estoque (com frascos devidamente identificados com pH e data);
-As mesmas devem ser trocadas com aproximadamente 6 meses de preparo;
-Para o preparo das soluções utilizar sempre água estéril;
-Após pesar os reagentes, nunca complete imediatamente com água para o volume final. Deve-se primeiro corrigir o pH para depois completar o volume;
-Nunca manipular eppendorfs contendo DNA sem luva para evitar a degradação do mesmo;
-Uma solução 1M = P.M. do reagente para 1 litro de solução.

1-Brometo de etídio (10 mg/ml)

Adicionar 1g de brometo de etídio a 100 ml de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético, até ter certeza de que o corante esteja dissolvido.

Armazenar a temperatura ambiente em recipiente de cor escura ou envolvido em folha de alumínio.

Obs: O brometo de etídio é um poderoso mutagênico e moderadamente tóxico. Durante o uso deste produto, ou solução que o contenha, é recomendável o uso de luvas e, para a pesagem deve-se utilizar máscaras apropriadas. Após o uso deste produto todos os recipientes devem ser descontaminados utilizando-se métodos apropriados.

2-Bromophenol blue (Azul de bromofenol) –Tampão de carregamento (10 ml)

Adicionar 0,042 g de azul de bromofenol a 7,0 ml de TAE 1x e 3,0 ml de glicerol. Estocar a temperatura ambiente.

3-Clorofórmio: Álcool Isoamil (24:1)

Juntar 24 partes de Clorofórmio a uma parte de Álcool isoamil.

4-CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) 20 % -100 ml

Adicionar 20 g de CTAB a 80 ml de água estéril. Aquecer até 60-80 ºC para facilitar a dissolução. Ajustar o volume para 100 ml com água estéril. Não é necessário esterilizar. Armazenar a temperatura ambiente.

5-Etanol 70 % (1000 ml)

Diluir 736,8 ml de álcool comercial a 95 % em 263,20 ml de água estéril.

6-EDTA (dissodium ethylenediaminetetra-acetate 2H_2O) 0,5 M (1,0 litro)

Adicionar 186,1 g de dissodium ethylenediaminetetra-acetate 2H_2O (EDTA) a 800 ml de água estéril. Agitar vagarosamente em agitador magnético. Mantendo a solução sobre o agitador magnético, ajustar o pH para 8,0 com a adição de NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH peletizada). O sal dissódico EDTA não dissolve enquanto o pH da solução não se aproxima de 8,0. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml, esterilizar por autoclavagem e armazenar a 4 ^{0}C.

7- Gel de agarose a 1,0 % para quantificação

Pesar 1,0 g de agarose e diluir em 100 ml de TBE 1X (trizma-base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5 M) ou TAE 1 X (trizma-base 0,1 M; ácido acético glacial 1M e EDTA 0,5M). Dissolver em microondas até a solução estar límpida. Adicionar de 2 µl a 3 µl de brometo de etídio a 10 mg/ ml e usar na quantificação após o gel solidificar.

8 – Gel de agarose a 3,0% para corrida de eletroforese de marcadores microssatélites

Semelhante ao gel de agarose a 1,0%, mas pesar 3,0 g de agarose. O gel se solidifica mais rapidamente.

9-Proteinase K – 50 µg/ml – Estoque-20 mg/ml

A quantidade de tampão a ser usada na diluição é obtida pela fórmula:

$(TxCFP)/(CIPx10)^3$ onde:

T= Volume do tampão a ser usado (N. de amostras x 700 ul + 10 %);

CFP= Concentração final da proteinase (50 ug/ml);
CIP= Concentração inicial da proteinase (20 mg/ml).

10 - Ribonuclease A 10mg/ml-1ml (solução estoque)

Dissolver 10 mg de RNAse A em 1,0 ml de acetato de sódio 0,01M (pH 5,2). Ajustar o pH para 7,4 adicionando Tris HCl 1M pH 8,0. Aquecer até 100^{0}C por 15 minutos. Deixar esfriar lentamente à temperatura ambiente. Armazenar a –20 ^{0}C

11 - Ribonuclease A 10 ug/ml em tampão TE – 1 ml

Juntar 10 µl de Tris HCl 1M pH 8,0, 2 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0, 1 µl de RNAse (10 mg/ml) e 987 µl de água estéril. Armazenar a 4 ºC.

12 – Solução de NaCl 5M (1,0 litro)

Dissolver 292,2 g de NaCl em 800 ml de água estéril. Ajustar o volume para 1 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames, autoclavar e armazenar a 4 ^{0}C.

13-Solução de NaCl 0,25 M (1,0 litro)

Dissolver 14,61 g de NaCl em 800 ml de água estéril. Ajustar o volume para 1 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames, autoclavar e armazenar a 4 ^{0}C.

14 - Tampão de extração TE- 100ml

1 ml de Tris-HCl 1M pH 8;
1 ml de EDTA 0,1M pH 8,0;
Completar com água destilada para 100ml e autoclavar por 20 minutos.

15 - Tampão de extração STE-1000ml

20 ml de NaCl 5M;
10 ml de Tris HCl 1M pH 8,0;
10ml de EDTA 0,1M pH 8,0;
Completar para 1000ml e autoclavar por 20 minutos.

16 - Tris 1M (pH 8,0) (1 litro)

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 ml de água estéril. Ajustar o pH para 8,0 adicionando aos poucos aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Aguardar a solução esfriar até a temperatura ambiente antes de fazer o ajuste final do pH.

Ajustar o volume da solução para 1,0 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml e esterilizar por autoclavagem. Armazenar a temperatura ambiente.

Ao final, se a solução apresentar coloração amarelada, descarte-a e obtenha Tris de melhor qualidade.

O pH da solução de Tris é dependente da temperatura e decresce aproximadamente 0,03 unidades de pH para cada aumento de 1 ºC de temperatura. Por exemplo: Uma solução de 0,05 molar tem valores de pH 9,5, 8,9 e 8,6 a 5 ºC, 25 ºC e 37 ºC, respectivamente.

17 - Meio de cultura LB (1 litro)

Dissolver 10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de Cloreto de sódio (NaCl) em 800mL de água destilada. Após completamente dissolvido completar o volume para 1L e esterilizar o meio em autoclave durante 20 minutos a 121°C. Para meio sólido, acrescentar 16g/L de Agar.

18 - $CaCl_2$0, 1M (100 mL)

Dissolver 1,47g de $CaCl_2.2H_2O$ ou 1,11g de $CaCl_2$ anidro em 90mL de água destilada. Completar o volume até 100mL e esterilizar por autoclavagem.

19 - $CaCl_2$ 0,1M + Glicerol 10% (100 mL)

Dissolver 1,47g de $CaCl_2.2H_2O$ ou 1,11g de $CaCl_2$ anidro em 50mL de água destilada. Adicionar 10mL de glicerol. Completar o volume até 100mL e esterilizar por autoclavagem.

20 - IPTG 100 mM (PM = 238,3) (Thiogaloctoside isopropílico ou beta-thiogalactopyranoside-D) (10 mL)

Dissolver 0,238 de IPTG em 10 mL de água destilada. Esterilizar por filtração em filtro de 0,22 mm em tubos tipo eppendorf. Armazenar a -20°C.

21- X-Gal 20 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3 indolil-β-D-galactopiranosideo) (10 mL)

Dissolver 200mg de X-Gal em 10 mL de dimetilformamida ou DMSO (dimetilsulfóxido). Aliquotar em tubos tipo eppendorf revestidos com papel alumínio para proteger da degradação pela luz. Armazenar a -20°C.

OBS: De acordo com Maniatis *et AL* solução de X-Gal não precisam ser esterilizadas.

22 - Ampicilina 100 mg/mL (10 mL)

Dissolver 100 mg de Ampicilina em 10 mL de água destilada. Esterilizar por filtração em filtro de 0,22 mm em tubos tipo eppendorf. Armazenar a -20°C.